

Lactobacillus acidophilus NCFM의 배양 및 저장 중 D(-) 및 L(+)-lactic acid의 변화

이경욱 · 신용국 · 백승천
서울우유 기술연구소

D(-) and L(+)-Lactic Acid Determination of *Lactobacillus acidophilus* during Fermentation and Storage Period

Kyung-Wook Lee, Yong-Kook Shin and Seung-Chun Baick
Institute of Dairy Foods Research, Seoul Dairy Co-operative

Abstract

The amount of D(-)-lactic acid in fermented dairy products is very important because the rate of metabolism of D(-)-lactic acid is lower than that of L(+)-lactic acid. The purpose of this study was to investigate the optimum condition during fermentation and storage of yogurt for the formation of isomers of lactic acid by *Lactobacillus acidophilus* NCFM. The production of acid was excellent at 37°C of fermentation and the ratio of D(-)-lactic acid was also lower than that of other conditions such as 35°C and 40°C. Among shaking and non-shaking treatment under aerobic condition and anaerobic condition, non-shaking treatment under aerobic condition was the best condition at the production of acid and L(+)-lactic acid during fermentation. During storage at low temperature, a larger amount of L(+)-lactic acid was produced than at higher storage temperature.

Key words: *L. acidophilus*, lactic acid, isomer

서 론

우리나라의 요구르트는 1970년대 초 일본에서 개발된 액상요구르트가 처음 생산된 후 1980년대에는 호상요구르트가 판매되었으며, 그 후 급격한 소비의 신장을 거친 후 최근에는 드링크요구르트에 이르기까지 고급화, 기능성의 길을 걷고 있다. 최근 국내의 유업체에서 생산하는 요구르트에 사용되는 균주의 특성은 주로 ABT계열(*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*)¹이 많이 사용되고 있으며, 이 중 *Lactobacillus acidophilus*는 건강적 측면에서 bifidobacteria와 함께 각광을 받고 있다. *L. acidophilus* NCFM은 1974년 미국의 North Carolina주립대학에서 sweet acidophilus milk를 개발한 이후 가장 안정적인 acidophilus milk의 균주로 이용되고 있으며 특히 저온에서의 초기 성장이 느린 장점이 이용되고 있다.

발효유제품의 성분으로 lactic acid는 발효유제품의 향미, 조직 및 영양면에서 주요한 역할을 담당하고 있다¹⁾. 유제품의 유당은 발효과정에 의해 lactic acid로 전이되며, 생산된 lactic acid는 D(-), L(+) 및 DL-lactic acid로 구분된다. 이러한 D(-), L(+) 및 DL-lactic acid는 미생물의 종류, 배지의 종류, 배양온도, 배양시간, 보존온도 등에 따라 구성비가 달라진다^{2,3)}. D(-)-lactic acid는 L(+)-lactic acid보다 대사의 속도가 현저히 느려서 혈액 중에 축적되어 산중독을 발생시킬 수도 있으며⁴⁾, 이러한 현상은 특히 유아나 어린이에게 현저하여 세계보건기구에서는 1966년 D(-)-lactic acid의 섭취량을 100 mg/kg body mass로 제한할 것을 권장하였으나, 1974년에는 이 권장 사항을 생후 3개월 이전의 유아로 한정하는 것을 발표하였다⁴⁾. 우리나라에서 생산되는 발효유제품의 L(+)-lactic acid의 조성은 액상요구르트의 경우 15.6 %에서 99.1 %, 호상요구르트에서는 이보다 높은 55.2 %에서 98.7 %로 보고하였다⁵⁾.

이 연구는 발효유 제조시 사용되는 *Lactobacillus acidophilus* NCFM의 lactic acid의 생성변이를 조사하므로써 발효유제조시 D(-)-lactic acid의 함량을 최소화

Corresponding author: Seung-Chun Baick, Institute of Dairy Foods Research, Seoul, Dairy Cooperative, 1059 Shingildong, Ansan, Kyunggi-do 425-120, Korea

하고 보존 중의 생성도 최소화하므로써 보다 인체에 유익한 발효유의 제조에 기초적인 자료를 제공하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

미생물

실험에 사용된 미생물은 Rhone-Poulenc사의 *Lactobacillus acidophilus* NCFM을 사용하였으며, 사용전에 MRS medium에 접종하고 37°C에서 3회 계대 배양하였다.

시료의 제조

미생물의 접종 전에는 MRS medium으로 37°C에서 계대 배양하였으며, 원유(서울우유협동조합, Korea)를 90°C에서 10분간 살균하여 사용하였다. 살균된 원유에 *Lactobacillus acidophilus* NCFM의 MRS medium 배양액을 접종한 후 35, 37, 40°C에서 5시간까지 배양하면서 시간별로 시료를 채취하였다. 혐기배양시에는 Anaerobic system (Forma scientific, U.S.A.)에서 배양하였으며, 교반배양시에는 Shaking incubator (Vision scientific Co., LTD, Korea)에서 200 rpm으로 교반하여 배양하였다. 또한 37°C에서 5시간 배양한 배양액을 5, 10, 15°C에서 저장하면서 10일간 매일 시료를 채취하였다.

pH 및 적정산도의 측정

배양액의 pH는 Orion 520A (Orion, U.S.A.)를 사용하였으며, 적정산도는 APHATM의 방법으로 실시하였다. 9 mL의 배양액을 취한 후 동량의 증류수로 피펫을 세척하여 첨가한 후 1% phenolphthalein용액 2방울을 첨가하고 이를 0.1 N NaOH로 적정하였다.

유산균의 생균수 측정

유산균수의 측정은 0.85% 생리적 식염수로 serial dilution을 실시한 후 MRS agar에 접종하고 37°C에서 48시간 배양하여 균락을 계수하였다.

D(-) 및 L(+)-lactic acid의 분석

D(-) 및 L(+)-lactic acid의 분석은 Olieman과 de Vries¹⁰⁾의 방법을 수정하여 실시하였다. 시료의 전처리 는 다음과 같이 실시하였다. 시료 200 μ L를 취하고 0.0085 N H₂SO₄용액 1 mL를 첨가한 후 이를 잘 혼합하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다(HMR-160 IV, Hanil, In., Co., Korea). 이 처리액의 상정액을

취한 후 0.45 μ m filter paper (Acrodisc 13CR PTFE, Gelman, U.S.A.)로 여과한 후 여액을 시료로 사용하였다.

시료의 분석은 HPLC로 실시하였다. HPLC는 Shimadzu Model LC-6A (Japan)를 사용하였다. 검출기는 Refractive Index Detector (RID-6A, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 시료의 주입량은 20 μ L였으며 이동상은 8 mM의 N, N-dipropyl-L-alanine (Sigma Chem., Co., U.S.A.)과 4 mM의 copper (II) acetate (Junsei Chem., Co., Ltd., Japan)를 사용하였으며 유속은 분당 0.8 mL이었다. 칼럼은 Nova-Pak C18 (4 μ m, 3.9 mm \times 150 mm, Waters, U.S.A.)을 사용하였다. 정량분석은 Chromate (Interface Engineering Co., Ltd., Korea)를 이용하여 피크의 면적을 측정하여 실시하였다.

결과 및 고찰

배양온도에 따른 pH, 적정산도 및 생균수의 변화

L. acidophilus NCFM의 살균유에서의 배양온도에 따른 pH 및 적정산도의 변화는 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같다. pH는 접종 후 5.86에서 지속적으로 하강하여 pH 4.99에서 4.36까지 떨어졌다. 적정산도의 변화도 0.30%에서 지속적으로 상승하여 0.57%에서 0.73%까지 증가하였다. pH와 적정산도의 변화에서 37°C에서 가장 성장이 빠른 것으로 나타났으며 40°C에서의 성장이 35°C에서 보다 우수한 것으로 나타났다. 시간에 따른 *L. acidophilus* NCFM의 성장에 따른 생균수의 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 37°C에서 가장 성장

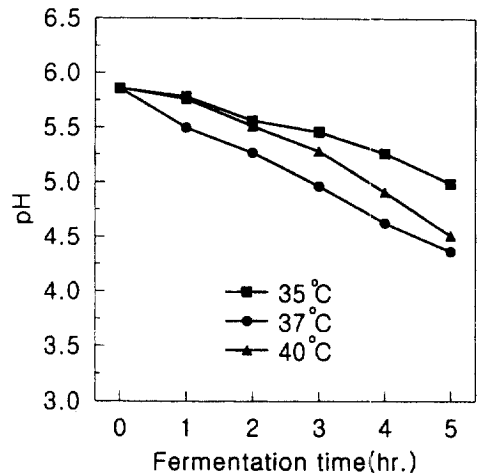


Fig. 1. pH changes in pasteurized milk at various incubation temperatures during fermentation by *L. acidophilus* NCFM.

이 빨랐으나 40°C의 경우 배양 3시간까지는 35°C와 유사하였으나 4, 5시간대에 급격한 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 일반적으로 *L. acidophilus*가 초기의 성장이 저조하다는 것과 같은 현상으로 사료되었다. 이 등¹⁾의 보고에 의하면 ABT-4 (Chr. Hansen Lab.)의 혼합균주로 제조한 요구르트의 경우 발효 3시간 이후 정체에 도달되었다. 그러나 이 실험은 *L. acidophilus*의 단독 배양인 관계로 일반적인 현상과는 달리 미생물의 정체가 도달이 pH 4.5부근이 아닌 것으로 사료되었다.

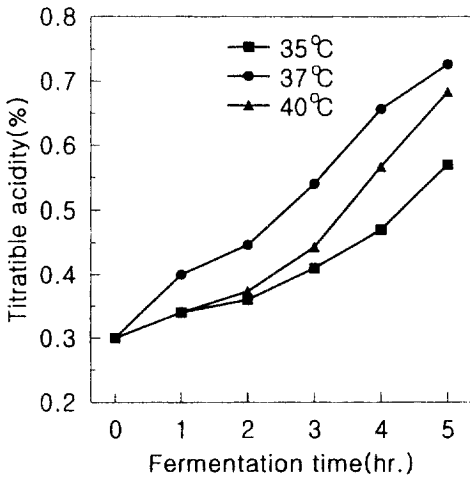


Fig. 2. Titratable acidity changes in pasteurized milk at various incubation temperatures during fermentation by *L. acidophilus* NCFM.

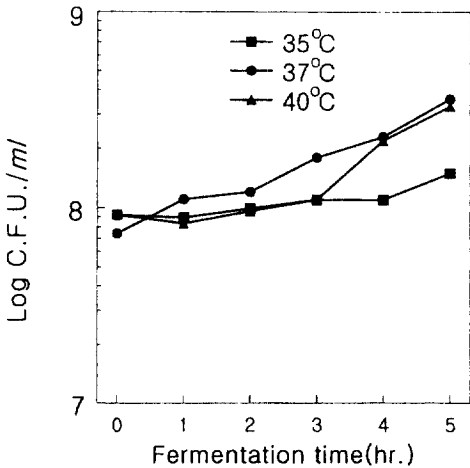


Fig. 3. Growth of *L. acidophilus* NCFM in pasteurized milk at various incubation temperatures.

배양온도에 따른 D(-) 및 L(+)-lactic acid의 생산 비율
 배양온도에 따른 *L. acidophilus* NCFM이 생산하는 D(-) 및 L(+)-lactic acid의 상대적 비율은 Fig. 4에서 나타난 바와 같았으며, 37°C에서 3시간 배양시의 크로마토그램은 Fig. 5와 같다. 최초 원유 및 접종된 배지에 존재하는 lactic acid에서는 D(-)-lactic acid가 37% 정도였으나, 성장 최적은도인 37°C에서는 이와 유사하게 유지되었다. 그러나 약간 감소하는 현상을 나타내었다. 40°C의 고온 배양시는 지속적으로 D(-)-lactic acid

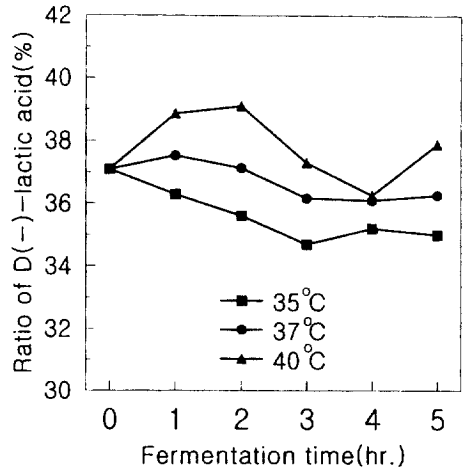


Fig. 4. Ratio changes of D(-) and L(+)-lactic acid in pasteurized milk at various incubation temperatures during fermentation by *L. acidophilus* NCFM.

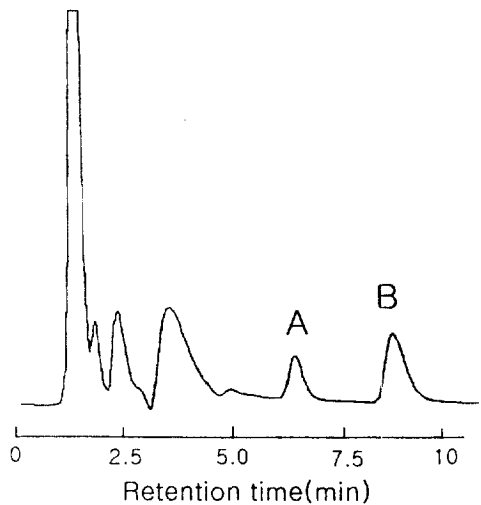


Fig. 5. Chromatogram of D(-) and L(+)-lactic acid in culture of *L. acidophilus* NCFM fermentation at 30°C for 3 hrs. A: D(+)-lactic acid, B: L(+)-lactic acid.

가 증가하여서 39% 전후를 나타내었으나 5시간 배양 시는 이보다 약간 감소한 38% 전후를 나타내었다. 저온인 35°C에서의 성장에서는 지속적으로 감소하여 5시간 배양시 35% 정도를 나타내었다. 이를 종합적으로 고찰하면 저온일수록 L(+)-lactic acid가 많이 생산되었으며 저온에서는 장시간 계속 유지될수록 L(+)-lactic acid의 비율이 증가되는 양상을 나타내었다.

Blumenthal 등⁹⁾은 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *S. thermophilus*를 1대 1로 혼합하여 탈지유에 배양한 경우 43°C에서 보다 38°C에서 L(+)-lactic acid가 많이 생산되었다고 보고하였으나, 발효시간이 지속됨에 따라 같은 온도에서는 오히려 D(-)-lactic acid의 함량이 급격히 증가하였다고 보고하였다. 또한 이 연구에 의하면 탈지유에 5% 탈지분유를 첨가한 경우에는 발효 초기에는 38°C에서, 발효 후기에는 43°C에서 D(-)-lactic acid의 함량이 높게 나타났다. 한편, Alm¹⁰⁾의 보고에 의하면 *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 등을 이용한 발효 butter milk의 경우에는 L(+)-lactic acid만 생산되었으며, *L. bugarius*와 *S. thermophilus*의 혼합 균주를 이용한 요구르트에서는 발효 시간이 경과됨에 따라 D(-)-lactic acid의 비율이 현저히 증가하는 양상을 나타내었다. 또한 *acidophilus* milk를 37°C에서 40시간 배양시 D(-)-lactic acid의 비율은 17시간에 10% 전후에서 40시간에는 20%까지 증가하였다.

배양조건에 따른 pH, 적정산도 및 생균수의 변화
L. acidophilus NCFM의 살균유에서의 배양조건에

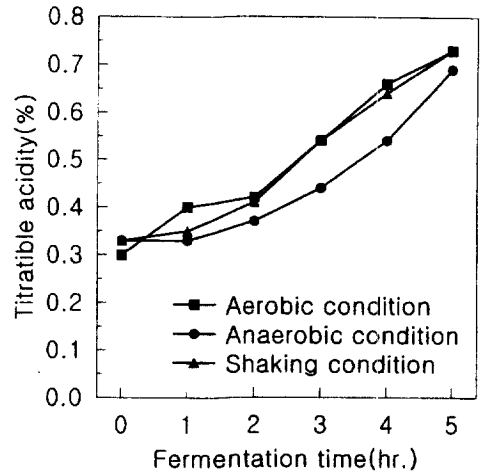


Fig. 7. Titratable acidity changes in pasteurized milk at various fermentation treatments by *L. acidophilus* NCFM.

다른 pH 및 적정산도의 변화는 Fig. 6과 Fig. 7에 나타난 바와 같다. 호기상태에서의 정치 및 교반조건과 혐기상태로 37°C에서 배양한 결과 호기의 정치 상태에서 가장 좋은 성장을 나타내었다. 교반상태는 정치상태보다는 pH강하 속도가 낮았으나, 혐기상태에서보다는 우수하였다. 적정산도 역시 유사한 경향을 나타내었으나 호기상태에서보다 정치와 교반에 따른 차이는 거의 나타나지 않았다.

배양조건에 따른 유산균의 생균수의 변화는 Fig. 8에 나타난 바와 같다. 최초 접종된 유산균의 수가 많

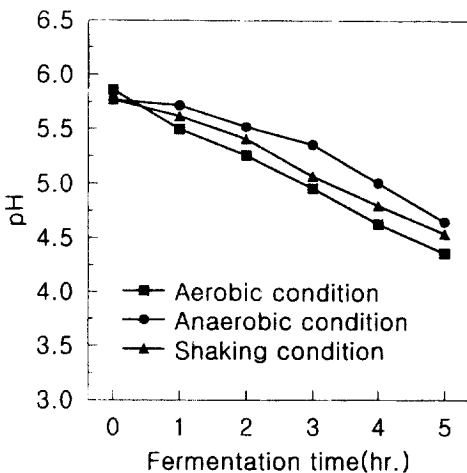


Fig. 6. pH changes in pasteurized milk at various fermentation treatments by *L. acidophilus* NCFM.

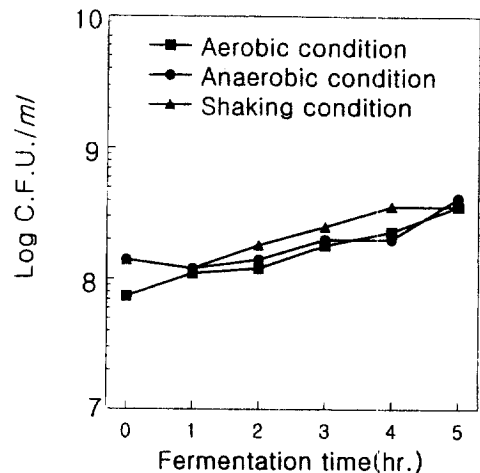


Fig. 8. Growth of *L. acidophilus* NCFM in pasteurized milk at various fermentation treatments by *L. acidophilus* NCFM.

은 혐기상태와 호기에서의 교반상태가 계속 많은 수를 유지하였으나 큰 차이는 나타나지 않았다.

배양조건에 따른 D(-) 및 L(+)-lactic acid 생산의 비율

L. acidophilus NCFM을 37°C에서 호기에서의 정치와 교반 및 혐기상태에서 배양시 D(-)-lactic acid의 비율은 Fig. 9에 나타난 바와 같다. 혐기상태에서는 34%에서 36.6%까지 약간의 증가 추세를 보였으나 거의 유사하게 유지되었다. 호기상태에서 정치배양의 경우에는 37% 전후로 약간의 감소현상을 나타내었으나 역시 큰 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 교반상태에서는 40%에서 점차 감소하여 5시간 배양시 34.7%까지 감소하였다. 즉 혐기상태, 호기에서의 정치 상태, 호기에서의 교반상태의 순서대로 높은 수준을 유지하였다.

저장온도에 따른 pH, 적정산도 및 생균수의 변화

저장온도에 따른 pH 및 적정산도의 변화는 Fig. 10과 Fig. 11에 나타난 바와 같다. pH는 온도가 높을수록 감소하는 속도가 크며, 최초 pH 4.36에서 10일째에 pH는 5°C에서 4.20, 10°C에서 3.98, 15°C에서 3.79를 나타내었다. 또한 적정산도도 pH와 같은 경향으로 증가하여 10일째는 5°C에서 0.94%, 10°C에서는 1.16%, 15°C에서는 1.39%를 나타내었다. 즉 저장온도가 높으면 후산발효가 지속적으로 일어나는 것으로 알 수 있었다. 김 등¹⁰⁾에 의하면 ABT혼합 배양 요구르트의 경우 pH는 4.18부근에서 9일간 저장시 10°C에서

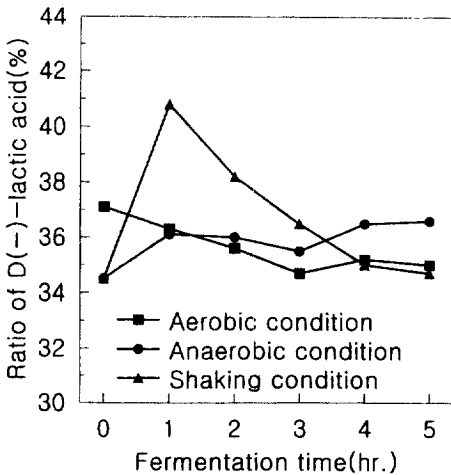


Fig. 9. Ratio changes of D(-) and L(+)-lactic acid in pasteurized milk at various fermentation treatments by *L. acidophilus* NCFM.

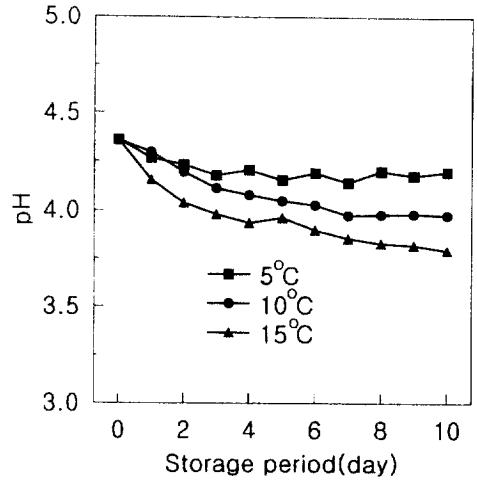


Fig. 10. pH changes in the cultures of *L. acidophilus* NCFM at various storage temperatures.

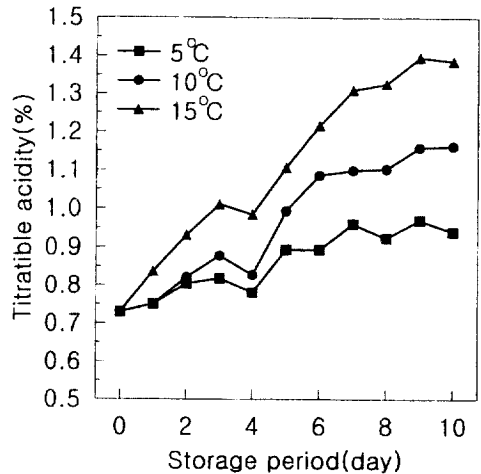


Fig. 11. Titratable acidity changes in the cultures of *L. acidophilus* NCFM at various storage temperatures.

4.15, 20°C에서는 4.0까지 떨어졌다. ABT혼합배양에 비하여 *L. acidophilus* 단독 배양의 경우에는 *L. acidophilus*의 강한 내산성력에 의해 더 많은 pH 강하가 일어나는 것으로 사료되었다. 또한 *L. acidophilus* NCFM은 산에 강하여 pH 4.0이하로 떨어지며 이에 따른 산의 생성도 지속됨을 알 수 있었다. 그러나 5°C에서는 pH 4.2를 전후하여 유지되었으나 10°C나 15°C에서는 계속적으로 강하되는 경향을 나타내었다. 즉 10°C나 15°C에서 어느 정도 발효가 일어남을 알 수 있었다. 저장 중 유산균수의 변화는 Fig. 12에 나타난 바와 같다. 저장 4일째까지는 약간의 생균수의 증가가 나타났으며, 7일에서 8일째까지는 생균수가 같은 수준으로

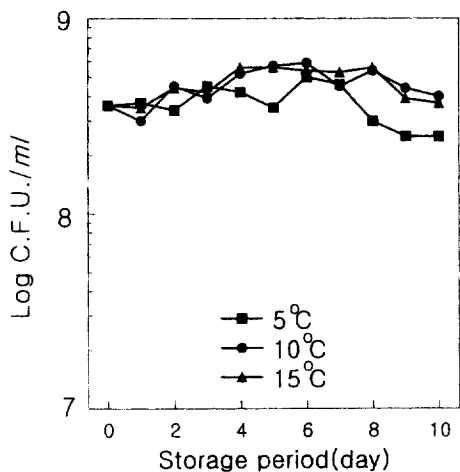


Fig. 12. Changes of the viable cells in the cultures of *L. acidophilus* NCFM at various storage temperatures.

유지되었으나 이후에는 감소현상을 나타내었다. 그러나 그 차이는 미미하여 큰 변화는 아니었다. 김 등⁶⁾은 ABT혼합배양 요구르트를 10°C와 20°C에서 저장시 생균수가 지속적으로 감소하였으며, 9일 이후 급속히 감소함을 보고하였다. 이러한 차이는 *L. acidophilus* 단독 배양과 혼합배양의 차이점에 기인되는 것으로 사료되었다.

저장온도에 따른 D(-) 및 L(+)-lactic acid의 생산 비율 저장 중 온도에 따른 D(-) 및 L(+)-lactic acid의 변화 비율은 Fig. 13에서 보는 바와 같다. 저장 중에 5°C보

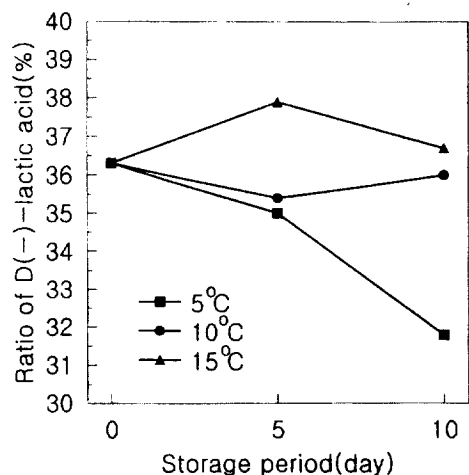


Fig. 13. Ratio changes of D(-) and in the cultures of *L. acidophilus* NCFM at various storage temperatures.

다는 10°C와 15°C에서의 D(-)-lactic acid의 비율이 높게 나타났으며 5일까지는 큰 차이가 없었으나 10일째는 5°C보다 10°C와 15°C에서 D(-)-lactic acid의 비율이 현저히 높게 나타났었다. 이러한 이유는 발효과정 중에서도 고온에서 D(-)형의 생산이 많았던 것과 동일한 결과로 볼 수 있었다. Blumenthal과 Heldling²⁾의 연구에서는 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*를 1대 1로 혼합하여 43°C의 원유에 배양한 후 4°C에서 4일간 저장시보다 10일간 저장시 D(-)-lactic acid의 비율이 높게 나타났으며, 38°C와 50°C에 배양한 경우에도 4°C에서 2일간 저장시보다 16일간 저장시 D(-)-lactic acid의 함유 비율이 높게 나타났다. 또한 10%의 당을 첨가한 원유를 43°C에서 발효시킨 후 4°C에서 4일간 저장시보다 10일간 저장시 전체적으로 약간 높은 비율의 D(-)-lactic acid를 생산하였다. Blumenthal 등³⁾의 보고에 의하면 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 1대 1 혼합 균주로 배양시 지방의 함량을 0, 2, 3.8%로 조정된 경우에도 4°C에서 5일간보다 10일간 저장시 D(-)-lactic acid의 함량이 높게 나타났다. 이러한 차이점은 각각의 사용 균주의 특성에 기인하는 것으로 사료되었다.

요 약

이 연구는 발효유 제조시 사용되는 *Lactobacillus acidophilus* NCFM이 생산하는 lactic acid의 생성변이를 조사하므로써 발효유 제조시 D(-)-lactic acid의 함량을 최소화하고 보존 중의 D(-)-lactic acid의 함량도 최소화하므로써 보다 인체에 유익한 발효유의 제조를 위한 기초적인 정보를 제공하기 위하여 실시되었으며, 그 결과는 다음과 같다.

발효온도는 37°C에서 산생성이 가장 우수하였으며, D(-)-lactic acid의 비율도 가장 낮았다. 보존온도에 따른 변이에서는 저온에서 후산생성도 적었으며, D(-)-lactic acid의 비율도 가장 낮았다. 또한 처리에 따른 산생성에서는 호기상태에서 산생성이 가장 우수하였으며, D(-)-lactic acid의 함량이 가장 낮았다.

문 헌

1. Alm, L.: Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. *J. Dairy Sci.*, **65**, 515 (1982)
2. Blumenthal, A. and Helbling, J.: Über die L(+) und D(-)-milchsäurenkonzentration verschiedener sauremilcharten. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.*, **62**, 159 (1971)
3. Blumenthal, A., Helbling, J. and Weymuth, H.: Über die L(+) und D(-) milchsäurenkonzentrationen von joghurts verschiedener hettgehalte. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters*

- Hyg.*, **64**, 403 (1973)
4. Olieman C. and de Vries, E.S.: Determination of D- and L-lactic acid in fermented dairy products with HPLC. *Neth. Milk Dairy J.*, **42**, 111 (1988)
 5. Park, I.D. and Hong, Y.H.: D(-)- and L(+)-lactic acids contents of commercial yogurts (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 520 (1991)
 6. APHA: Standard methods for the examination of dairy products. 16th ed. American Public Health Association, Washington D.C. (1991)
 7. Lee, K.W., Suh, D.S., Kim, E.A. and Kwak, H.S.: The chemical and sensory characteristics of gel type yogurt during fermentation. *Bull. Dairy Food Res. Seoul Dairy Co-op.*, **4**, 57 (1992)
 8. Kim, E.A., Lee, K.W., Park, Y.H. and Kwak, H.S.: The study of lactic acid bacteria in yogurt during delivery and storage (in Korean). *Korean J. Dairy Sci.*, **14**(3), 260 (1992)
-

(1997년 11월 20일 접수)